

АЛЕЛНА ВАРИЈАБИЛНОСТ ПУРОИНДОЛИНА СОРТИ ХЕКСАПЛОИДНЕ ПШЕНИЦЕ (*Triticum aestivum* L.)

Обрехт Драгана¹, Денчић С.², Ђан Михајла¹, Кочиш Тубић Наташа¹, Вапа Љиљана¹

¹Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду,
Трг Доситеја Обрадовића 2., Нови Сад, Србија

²Институт за ратарство и повртарство, Максима Горког 30, Нови Сад, Србија

Abstract

OBREHT, Dragana¹, S.² DENČIĆ, Mihajla¹ ĐAN, Nataša¹ KOČIŠ TUBIĆ, Ljiljana¹ VAPA: PUROINDOLINE ALLELIC VARIABILITY IN HEXAPLOID WHEAT (*Triticum aestivum* L.) CULTIVARS. [¹Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg D. Obradovica 2, 21000 Novi Sad, Serbia, ²Institute of Field and Vegetable Crops, M. Gorkog 30, 21000 Novi Sad, Serbia]

The puroindoline loci *Pina-D1* and *Pinb-D1* located on the 5D chromosome in hexaploid wheat are involved in genetic control of endosperm texture. Soft texture (dominant form) is coded by dominant *Pin-D1* alleles, while various mutations in puroindoline genes cause hard endosperm texture. Analysis of 32 hexaploid wheat cultivars has revealed 13 cultivars with soft endosperm texture (*Pina-D1a/Pinb-D1a*), and 19 cultivars with hard texture (14 *Pina-D1a/Pinb-D1b*, 5 *Pina-D1b/Pinb-D1a*). Variation in the milling and bread-making quality properties between hard and soft textured cultivars were tested, and results showed highly significant differences for water absorption and loaf volume and significant difference for sedimentation value. Variations in the wet gluten content and milling score were not caused by *Pin-D1* allelic variability.

Key words: hexaploid wheat, puroindolines, allelic variability.

Сажетак

Пуринолински локуси *Pina-D1* и *Pinb-D1*, смештени на кратком краку хромозома 5D хексаплоидне пшенице, су укључени у контролу текстуре ендосперма. Доминантна форма *Pin-D1* алела кодира меку текстуру ендосперма, док различите мутације у генима за пуринодолине доводе до појаве тврде текстуре. Анализом 32 сорте хексаплоидне пшенице, утврђено је да 13 сорти има меку текстуру (*Pina-D1a/Pinb-D1a*) и 19 сорти тврду текстуру ендосперма (14 *Pina-D1a/Pinb-D1b*, 5 *Pina-D1b/Pinb-D1a*). Тестирањем значајности разлика средњих вредности посматраних параметара технолошког квалитета између генотипова меке и тврде текстуре утврђено је да алелна композиција *Pin-D1* локуса има веома значајан ефекат на параметре моћ упијања воде и запремину хлеба и значајан ефекат на седиментациону вредност. Алелна варијабилност *Pin-D1* локуса није показала значајан ефекат на варирање параметара садржај влажног глутена и израшњавање.

Кључне речи: хексаплоидна пшеница, пуринодолини, алелна варијабилност.

УВОД

Захваљујући својим јединственим карактеристикама, брашно хлебна пшеница (*Triticum aestivum* L.) има способност формирања теста које кроз технолошке процесе омогућава производњу хлеба, пецива и широког спектра прехранбених производа. За разлику од *Triticum durum*, тетраплоидне пшенице са изразито тврдом текстуром ендосперма, *T. aestivum* може имати ендосперм меке или тврде текстуре. Тврдоћа зрна има значајан утицај на млевење, процес печења хлеба и квалитет финалног производа. За производњу хлеба и пецива употребљава се пшеница тврде текстуре ендосперма, са садржајем протеина изнад 11%, чије брашно има већу моћ упијања воде и високу еластичност у технолошком процесу обраде теста.

Главни генетички фактор који условљава текстуру ендосперма представљају *Pina* и *Pinb* гени. Претпоставља се да продукти ових гена, пуриноидолини а и б, контролишу степен адхезије протеина матрикса за површину скробних гранула у зромом зрну (Rakszegi и сар., 2008). Gautier и сар. (1994) су клонирани и окарактерисали гене *Pina-D1* и *Pinb-D1*. Поређењем секвенци клонова добијених из генотипова са тврдом и меком текстуром ендосперма, утврђено је да извор фенотипа тврда текстура може бити двојак: мутација у *Pina-D1* која за последицу има потпуни недостатак пуриноидолина а или специфичне тачкасте мутације у оквиру триптофаном богатог региона гена *Pinb-D1* (Lillemo и Morris, 2000).

Према најновијим подацима (Wang и сар., 2008) пронађено је 17 различитих алела у гену за PINA (*Pina-D1a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, q*) и 26 различитих алела у гену за PINB (*Pinb-D1a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, q, r, s, t, u, v, w, x, aa, ab*). Већина дефинисаних мутација у *Pina-D1* и *Pinb-D1* откривена је секвенционирањем изолованих клонова, а само за неколико алелних форми су дефинисани широкопроменљивим маркер системима. Gautier и сар. (1994) су дефинисали олигонуклеотидне ДНК зачетнице (прајмере) погодне за откривање мутације у *Pina-D1* методом ланчане реакције полимеразе (PCR), док су Gioux и Morris (1997) и Lillemo и Morris (2000) дефинисали маркер систем за разликовање алела у локусу *Pinb-D1*.

Циљ овог рада је испитивање алелне композиције *Pina-D1* и *Pinb-D1* локуса хлебне пшенице (*T. aestivum*) применом маркера заснованих на методи ланчане реакције полимеразе и анализа утицаја генотипа на технолошке параметре квалитета брашна и хлеба.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Анализиране су 32 сорте пшенице, од којих су 6 служиле као контроле (Мина, Сава, Балкан, Cook, Siete Cerros, UPI 301) и њихови генотипови су унапред били познати (Обрехт, 2005). За испитивање присуства *Pinb-D1c* алела коришћене су још 2 додатне контроле Ladoga и Red Bobs (Табела 1). Све анализиране сорте су пореклом из генетичке колекције Института за ратарство и повртарство у Новом Саду.

Анализирана ДНК је изолована СТАВ (cetyltrimethylammonium bromide) методом из клијанаца старих 7 дана. За све анализиране локусе коришћена је јединствена реакциона смеша за ланчану реакцију полимеразе која се састојала из: 1x Taq пуфер (500 mM KCl, 100 mM Tris HCl (pH 9.0) и 1% Тритон X-100), 1,5 mM MgCl₂, 200 μM смеша дeоксинуклеотида (dNTPs), 10 pmol сваког прајмера, 1 јединица ензима Taq полимеразе и 30 ng ДНК. Програм за реакцију ланчане амплификације био је јединствен за све локусе, осим варирања у температури везивања прајмера за матричну ДНК (93°C 4 мин, 94°C 1 мин, 72°C 90 s, 72°C 10 мин). Температуре везивања прајмера биле су 58°C за *Pina-D1* (Gautier и сар., 1994) и *Pinb-D1b* (Gioux и Morris, 1997), 62°C за *Pinb-D1a* (Lillemo и Morris, 2000).

Присуство *Pinb-D1c* алела вршено је помоћу рестриктоног ензима Pvu II у реакцији рестриктоног дигестије волумена 30 микролитара. Две јединице рестриктоног ензима и 3 микролитра одговарајућег NEB 2 пуфера (BioLabs USA) је додато у продукте амплификације *Pinb-D1*, и инкубирано 1 час на 37°C. У циљу идентификације различитих алела, продукти реакције ланчане амплификације свих анализираних локуса су раздвојени електрофорезом на 2% агарози, а затим визуелизирани под UV лампом. Присуство одређеног алела је одређивано поређењем са контролама, чији су генотипови унапред били познати.

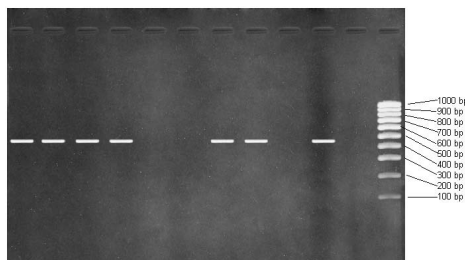
За анализу ефекта различите композиције *Pin-D1* локуса на вредности технолошких параметара квалитета пшенице коришћени су подаци Института за ратарство и повртарство у Новом Саду. Све примењене методе су одобрене и

стандардизоване од стране ICC (International Association for Cereal Science and Technology). Седиментациона вредност (ml) одређивана је методом по Зелену. Метода је базирана на праћењу брзине седиментације брашна у раствору млечне киселине. Уколико брашно има виши садржај протеинског комплекса глутена, успорава се седиментација (мерена у минутима) и добија се виша седиментациона вредност (мерена у ml). Садржај влажног глутена (%) је одређиван према стандардном Брабендер методу. Метода је базирана на утврђивању удела протеинског комплекса глутена у брашну. Глутен се издваја из теста замешеног од брашна и воденог раствора натријум хлорида, суши се и мери се његова тежина. Процентни удео тежине глутена у односу на почетну тежину теста представља параметар садржај влажног глутена. Моћ упијања воде (МУВ) је параметар којим се утврђује удео (%) воде (мерено у ml на сваких 100 g брашна) које тесто може да прими да би се постигла жељена конзистенција теста (500 фаринолошких јединица), мерена Брабендеровим фаринографом. Избрашњавање или ниво екстракције брашна је параметар којим се утврђује ниво сепарације садржаја ендосперма у односу на остале делове зрна пшенице (клица и спољашњи омотачи). Стандардни ниво за бело брашно је 60%, а варијације које се појављују између различитих сорти могу бити приписане утицају текстуре ендосперма (односно тврдоћи зрна) пшенице. Запремина (волумен) хлеба (ml) се одређује волуметром пуњеним просом, где се волумен векне хлеба посредно утврђује мерењем истиснутог волумена проса (ml).

Израчунате су средње вредности двогодишњих података за технолошке параметре квалитета брашна и хлеба. Затим је т-тестом тестирано да ли постоји статистички значајна разлика средњих вредности анализираних параметара између сорти пшенице тврде и меке структуре ендосперма.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

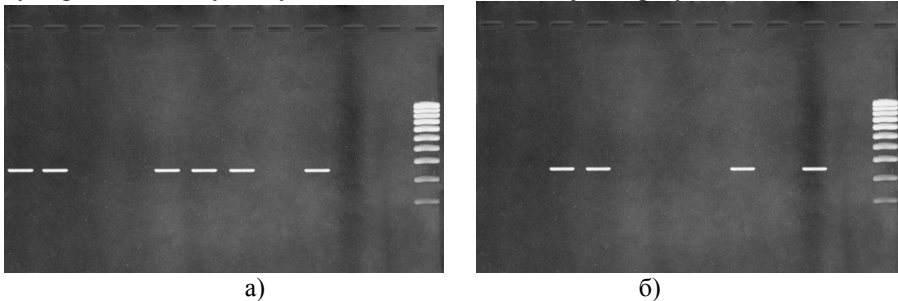
Испитивани су *Pina-D1* и *Pinb-D1* локуси код 32 сорте пшенице. Амплификацијом кодирајућег региона *Pina-D1* гена у случајевима присуства дивљег типа алела *Pina-D1a*, добијен је продукт дужине око 450 bp. Обзиром на специфичан дизајн олигонуклеотида за ланчану реакцију полимеразе, уколико у овом локусу постоји мутација јављаће се нулти алел (*Pina-D1b*), односно, изостаће продукт амплификације (Слика 1). За откривање мутације која доводи до замене аминокиселине Gly-46 за аминокиселину Ser-46 у оквиру протеинског продукта *Pinb-D1* локуса, коришћена су два различита прајмера за амплификацију.



Слика 1: Гел електрофореза *Pina-D1* локуса: присуство "трака" означава *Pina-D1a* алел, док одсуство означава *Pina-D1b* алел (са лева на десно: Мина, Сава, Балкан, Cook, Siete Cerros, UPI 301, Acciao, Akakomughi, Amigo, Aobakomughi, MW 100bp)

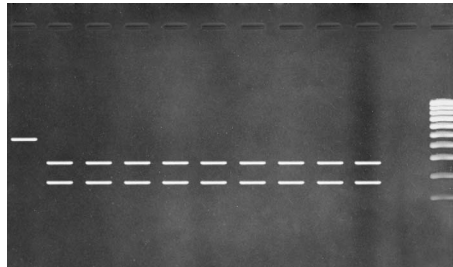
При коришћењу глицинског прајмера, уколико је дошло до мутације (Gly-46 у Ser-46) јављао се нулти алел (Слика 2а), док је при коришћењу серинског, случај био

обрнут (Слика 2б). У оба случаја продукти амплификације су били величине око 250bp. Присуство мутације се може потврдити и помоћу само једног типа олигонуклеотида, али су коришћена оба у циљу повећања тачности добијених резултата.



Слика 2. Гел електрофореза *Pinb-D1* локуса: (а) присуство "траке" уз примену Gly 46 прајмера означава *Pinb-D1a* алел, док одсуство означава *Pinb-D1b* алел, (б) уз примену Ser-46 прајмера присуство и одсуство "трака" имају обрнуто значење (редослед и за а и за б: Мина, Сава, Балкан, Cook, Siete Cerros, UPI 301, Acciao, Akakomughi, Amigo, Aobakomughi).

Присуство *Pinb-D1c* алела је било тестирано помоћу рестрикционог ензима *Pvu II*, којим су третирано продукти амплификације *Pinb-D1* локуса у којој је амплификован кодирајући део *Pinb-D1* гена. Продукти рестрикционе дигестије били су раздвојени агарозном гел електрофорезом. Уколико је алел *Pinb-D1c* присутан, ендонуклеаза није секла продукте амплификације и на гелу се јављала 1 "трака", а 2 "траке" су се јављале уколико овај алел није присутан (Слика.3).



Слика 3. Гел електрофореза *Pina-D1* локуса третмана рестрикционим ензимом: присуство једне „траке“ означава *Pina-D1c* алел, док 2 „траке“ означавају одсуство овог алела (Ladoga, Red Bobs, Мина, Сава, Балкан, Cook, Siete Cerros, UPI 301, Acciao, Akakomughi)

Анализом алелне варијабилности утврђено је да је *Pina-D1a* алел пронађен код 27 сорти, а код осталих 5 сорти је био присутан *Pina-D1b* алел (Табела 1). Фреквенција алела а износила је 0,84, а алела б 0.16. Ни једна сорта није поседовала *Pinb-D1c* алел. Алел *Pinb-D1a* је нађен код 18 сорти, док је *Pinb-D1b* нађен код 14 сорти. Фреквенције алела а и б у овом локусу износиле су, редом, 0,56 и 0,44.

На основу ових података све сорте су подељене у 2 групе: меке, генотип аа (поседују а алеле у оба локуса) и тврде, генотип аб или ба (поседују б алел у једном од локуса). Нису пронађене сорте које поседују б алеле у оба локуса. Међу испитиваним сортама пронађено је 13 меких и 19 тврдых сорти (Табела 1).

Применом т-теста анализиран је утицај генотипова (аа - меке сорте и аб, ба - тврде сорте) на варирање средњих вредности технолошких параметара заснованих на двогодишњем просеку (Табела 2).

Статистичком обрадом података утврђена је значајна статистичка разлика између средњих вредности за параметар седиментациона вредност између меких и

тврдих сорти. Веома значајна статистичка разлика је добијена за параметре моћ упијања воде и запремина хлеба, док за садржај влажног глутена и избрашњавање није утврђена статистички значајна разлика између меких и тврдих сорти пшенице.

Табела 1. Назив, порекло и генотип анализираних и контролних сорти пшенице.

Назив сорте	Земља порекла	Генотип	Назив сорте	Земља порекла	Генотип
Acciao	ITA	aa	Cook	AUS	аб
Auburn	SAD	aa	Jubilejnaja 50	RUS	аб
Caldwell	SAD	aa	Kite	AUS	аб
Fortunato	ITA	aa	HC 0.1082	SER	аб
Klein Toledo	ARG	aa	HC 55-25	SER	аб
Lerma Rojo	MEX	aa	HCII 16	SER	аб
Mara	ITA	aa	Peking 11	CHN	аб
Мина	SER	aa	Радика	MKD	аб
Norin 10	JPN	aa	Stepnjačka 30	RUS	аб
HC 45/00	SER	aa	Talent	FRA	аб
Rusalka	BGR	aa	Amigo	USA	ба
Saitama 27	JPN	aa	Arg. 80/5216	ARG	ба
Сава	SER	aa	Siete Cerros	MEX	ба
Akakhomughi	JPN	аб	Супер златна	HRV	ба
Aobakomughi	JPN	аб	УПИ 301	IND	ба
Балкан	SER	аб	Ladoga	RUS	ац
Banks	AUS	аб	Red Bobs	CAN	aa

Табела 2. Средње вредности технолошких параметара по групама сорти и вредност т-теста.

Параметар	Вредности параметара за		т - тест
	меке сорте (aa)	тврде сорте (аб, ба)	
Седиментациона вредност [мл]	25,08	31,53	2,53*
Садржај влажног глутена [%]	38,80	28,65	0,981
Моћ упијања воде [%]	56,69	60,81	3,87**
Избрашњавање [%]	62,66	62,72	0,049
Запремина хлеба [мл]	1059,62	1236,32	2,977**

Ниво статистичке значајности: * - $P=0,05$ (значајна разлика), ** - $P=0,01$ (веома значајна разлика)

У сваком од проучаваних *Pin-D1* локуса откривено је присуство по два алела. У *Pina-D1* доминирао је дивљи тип алела *Pina-D1a* у односу на мутантни алел *Pina-D1b*, док је у *Pinb-D1* знатно чешћи био *Pinb-D1b* у односу на алел *Pinb-D1a*. На основу добијених резултата сорте су подељене у две групе (меке-генотип aa и тврде-генотипови аб и ба) према класификацији Giroux и Morris (1997). *Pinb-D1c* алел је веома редак и није био присутан ни код једне од анализираних сорти. Овај алел је карактеристичан за сорте из Северне Европе: Норвешка, Шведска, Финска (Lillemo и Morris, 2000). Истраживањем које су спровели Chen и сар. (2006) овај алел није био пронађен ни код кинеских сорти пшенице. Поменуто истраживање, такође, показује да су у Кини заступљене сорте са *Pinb-D1b* алелом, јер имају боље карактеристике значајне у процесу прављења хлеба у односу на друге сорте.

Тестирањем значајности разлика средњих вредности за посматране параметре између група генотипова меке и тврде текстуре ендосперма, уочена је значајна разлика за седиментациону вредност, док су се веома значајне разлике јављале за моћ упијања воде и запремину хлеба.

Уочена значајна разлика за седиментациону вредност је у сагласности са резултатима Igrejas и сар. (2001) који су утврдили значајне разлике седиментационе вредности између сорти са меком и тврдом текстуром ендосперма, и уочена разлика тумачена је негативним ефектом високог садржаја пуриноидина б на седиментациону вредност меких генотипова.

Садржај влажног глутена је параметар који претежно зависи од садржаја протеина, те се и очекивало да разлике међу испитиваним групама сорти не буду сигнификантне. За избрашњавање добијене су вредности 62,66% за меке и 62,72% за тврде сорте. Између добијених вредности не постоји статистички значајна разлика, што је у супротности од очекиваног. Martin и сар. (2001) су показали да постоји значајно већа вредност избрашњавања код меких сорти у односу на тврде. Такође су показали да је тврдоћа зрна у негативној корелацији са вредностима овог параметра.

Моћ упијања воде је блиско повезана са тврдоћом ендосперма. Током млевења пшеничних зрна тврдих сорти, скробне грануле бивају више оштећене, па брашно упија више воде у процесу прављења теста (Slaughter и сар., 1992). Средње вредности овог параметра за меке и тврде сорте су, редом, износиле 56,69% и 60,81% и показују значајну статистичку разлику. Добијени резултати су у сагласности са резултатима Cane и сар. (2004). Обзиром на корелативни однос између параметара моћ упијања воде и запремина хлеба, веома значајна разлика у параметру запремина хлеба између сорти меке и тврде текстуре ендосперма је била очекивана, а значајно веће вредности за запремину хлеба код тврдих сорти запазили су и Dubreil и сар. (1998), као и Martin и сар. (2001).

ЛИТЕРАТУРА

1. Cane, K., M. Spackman, H. A. Eagles (2004): Puroindoline genes and their effect on grain quality traits in southern Australian wheat cultivars. *Australian Journal of Agricultural Research* 55: 89-95.
2. Chen F., Z. H. He, X. C. Xia, L. Q. Xia, X. Y. Zhang, M. Lillemo, C. F. Morris (2005): Molecular and biochemical characterion of puroindoline a and b alleles in Chinese landraces and historical cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 400-409.
3. Dubreil, L., S. Meliande, H. Chiron, J-P. Compoint, L. Quillien, G. Branlard, D. Marison (1998): Effect of puroindolines on the breadmaking properties of wheat flour. *Cereal Chemistry* 75: 222-229.
4. Gautier, M-F., M-E. Aleman, A. Guirao, D. Marion, P. Joudrier (1994): *Triticum aestivum* puroindolines, two basic cystine-rich seed proteins: c-DNA sequence analysis and developmental gene expression. *Plant Molecular Biology* 25: 43-57.
5. Giroux, M. J., C. F. Morris (1997): A glycine to serine change in puroindoline b is associated with wheat grain hardness and low levels of starch-surface friabilin. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 857-864.
6. Igrejas, G., T. Gaborit, F-X. Oury, H. Chiron, D. Marison, G. Branlard (2001): Genetic and environmental effects on puroindoline-a and puroindoline-b content and their relationship to tehnological properties in French bread wheats. *Journal of Cereal Science* 34: 37-47.
7. Lillemo, M., C. F. Morris (2000): A leucine to proline mutation in puroindoline b is frequently present in hard wheats from Northern Europe. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 1100-1107.
8. Martin, J. M., R. C. Frohberg, C. F. Morris, L. E. Talbert, M. J. Giroux (2001): Milling and bread baking traits associated with puroindoline sequence type in hard red spring wheat. *Crop Science* 41: 228-234.

9. Обрехт, Д. (2005): Генетичка евалуација компоненти технолошког квалитета пшенице применом молекуларних маркера. Докторска дисертација, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду.
10. Rakszegi, M., M. D. Wilkinson, P. Tosi, A. Lovegrove, G. Kovacs, Z. Bedo, P. R. Shewry (2008): Puroindoline genes and proteins in tetraploid and hexaploid species of *Triticum*. *Journal of Cereal Science* doi: 10.1016/j.jcs.2008.09.006.
11. Slaughter, D. C., K. H. Norris, W. R. Hruschka (1992): Quality and classification of hard red wheat. *Cereal Chemistry* 69: 428-432.
12. Wang, J., J. Sun, D. Liu, W. Yang, D. Wang, Y. Tong, A. Zhang (2008): Analysis of *Pina* and *Pinb* alleles in the micro-core collections of Chinese wheat germplasm by Ecotilling and identification of anovel *Pinb* allele. *Journal of Cereal Science* doi:10.1016/j.jcs.2008.06.005.

Примљено: 09. 12. 2010.

Одобрено: 19. 07. 2011.